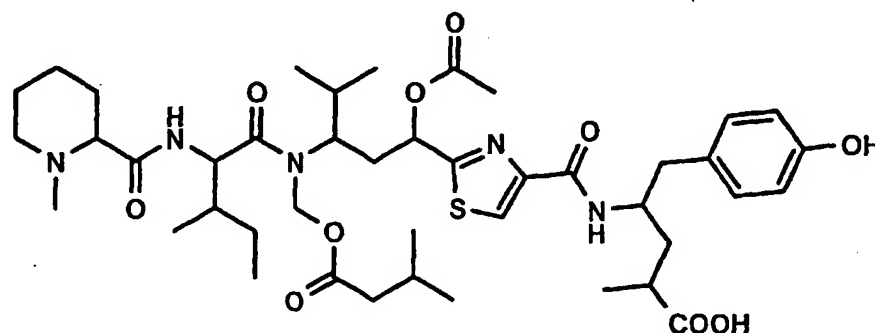


(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/005326 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 5/06, A61K 47/48
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007415
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Juli 2003 (09.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 30 875.6 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE  
103 05 531.2 11. Februar 2003 (11.02.2003) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MORPHOCHEM AKTIENGESellschaft FÜR KOMBINATORISCHE CHEMIE [DE/DE]; Gmunder Str. 37-37a, 81379 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOEMLING, Alexander [DE/DE]; Franckensteinstrasse 9 A, 81243 München (DE). WEBER, Lutz [DE/DE]; Edelweissstrasse 8, 82110 Germering (DE).
- (54) Title: TUBULYSIN CONJUGATES
- (54) Bezeichnung: TUBULYSINKONJUGATE
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



Tubulysin A

(57) Abstract: The invention relates to novel tubulysin conjugates (e.g. of tubulysin A) and the use thereof in the treatment of cancer diseases.

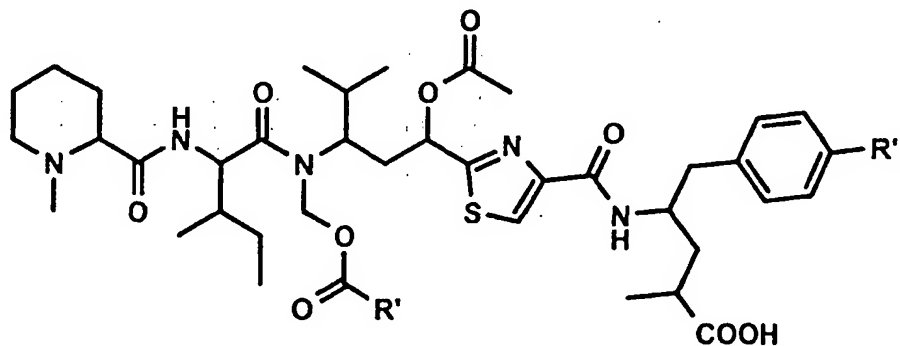
(57) Zusammenfassung: Die Vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-Konjugate (z. B. von Tubulysin A) sowie deren Verwendung zur Behandlung von Krebserkrankungen.

## Tubulysinkonjugate

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Tubulysin-konjugate sowie deren Verwendung zur Behandlung von Krebserkrankungen.

5

Die Tubulysine wurden erstmals von der Gruppe von Höfle und Reichenbach (GBF Braunschweig) aus einer Kulturbrühe von Stämmen des Myxobakteriums *Archangium gephyra* isoliert (F. Sasse et al. J. Antibiot. 2000, 53, 879-885; WO9813375; DE 10008089). Diese Verbindungen haben eine ausgesprochen hohe cytotoxische Aktivität gegenüber Säugetierzelllinien mit  $IC_{50}$ -Werten im picomolaren Bereich und sind daher als potentielle Krebsmedikamente von grossem Interesse.



15

Tubulysin A:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = OH$

Tubulysin B:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$

Tubulysin C:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = OH$

20

Tubulysin D:  $R' = CH_2CH(CH_3)_2$ ;  $R'' = H$

Tubulysin E:  $R' = CH_2CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$

Tubulysin F:  $R' = CH_2CH_3$ ;  $R'' = H$

Die extrem hohe Cytotoxizität einiger Tubulysine bringt aber auch Nachteile mit sich: eine hohe allgemeine Toxizität sowie eine geringe Selektivität gegenüber normalen Zellen.

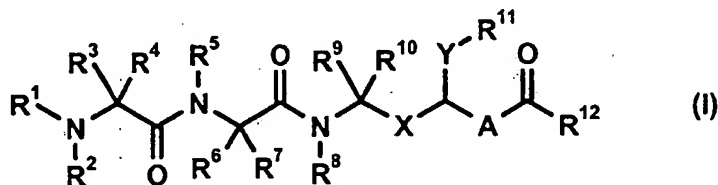
25

Ziel der vorliegenden Erfindung war es daher insbesondere, die Toxizität von Tubulysinen zu senken sowie ihre Selektivität zu steigern.

- 5 Diese Aufgabe wird durch Bereitstellung von Tubulysinkonjugaten der allgemeinen Formel U-V-W gelöst, in der

U die Formel (I) aufweist,

10



wobei

- 15 A ein gegebenenfalls substituierter 5- oder 6-gliedriger Heteroaromat ist;

X ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$  ist;

20

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{16}$  ist und

- 25 die Reste  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$ ,  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$ ,  $\text{R}^{15}$  und  $\text{R}^{16}$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocyclo-alkyl-, Aralkyl- oder ein Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam Teil  
30 eines Cycloalkyl- oder Heterocycloalkylringsystems sind,

V ein Linker und W ein Polymer oder ein Biomolekül ist.

Erfindungsgemäß wurde also gefunden, dass Polymerkonjugate  
5 bzw. Biokonjugate von speziellen Tubulysinen bessere  
pharmakologische Eigenschaften und vor allem eine höhere  
Selektivität bei gegebener Cytotoxizität sowie bei  
geringerer Toxizität als die unkonjugierten Verbindungen  
aufweisen. Dies führt dazu, dass im menschlichen und  
10 tierischen Körper bevorzugt Krebszellen angesteuert und  
gesundes Gewebe geschont wird.

Der Ausdruck Alkyl oder Alk bezieht sich auf eine  
gesättigte, geradkettige oder verzweigte Kohlenwasser-  
15 stoffgruppe, die 1 bis 20 Kohlenstoffatome, vorzugsweise 1  
bis 12 Kohlenstoffatome, besonders bevorzugt 1 bis 6  
Kohlenstoffatome aufweist, z.B. die Methyl-, Ethyl-,  
Propyl-, Isopropyl-, Isobutyl-, tert-Butyl, n-Hexyl-,  
2,2-Dimethylbutyl- oder n-Octyl-Gruppe.

20 Die Ausdrücke Alkenyl und Alkynyl beziehen sich auf  
zumindest teilweise ungesättigte, geradkettige oder  
verzweigte Kohlenwasserstoffgruppen, die 2 bis 20  
Kohlenstoffatome, vorzugsweise 2 bis 12 Kohlenstoffatome,  
25 besonders bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatome aufweisen, z.  
B. die Ethenyl-, Allyl-, Acetylenyl-, Propargyl-, Isoprenyl-  
oder Hex-2-enyl-Gruppe. Bevorzugt weisen Alkenylgruppen eine  
oder zwei (besonders bevorzugt eine) Doppelbindungen bzw.  
Alkynylgruppen eine oder zwei (besonders bevorzugt eine)  
30 Dreifachbindungen auf.

Des weiteren beziehen sich die Begriffe Alkyl, Alkenyl und  
Alkynyl auf Gruppen, bei der ein oder mehrere

Wasserstoffatome durch ein Halogenatom (bevorzugt F oder Cl) ersetzt sind wie z. B. die 2,2,2-Trichlorethyl-, oder die Trifluormethylgruppe.

- 5 Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich auf eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynyl-Gruppe, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor-, Bor-, Selen-, Silizium- oder Schwefelatom ersetzt sind (bevorzugt Sauerstoff, Schwefel  
10 oder Stickstoff). Der Ausdruck Heteroalkyl bezieht sich des weiteren auf eine Carbonsäuregruppe oder eine von einer Carbonsäure abgeleitete Gruppe wie z. B. Acyl (Alkyl-CO-), Acylalkyl, Alkoxycarbonyl, Acyloxy, Acyloxyalkyl, Carboxyalkylamid oder Alkoxycarbonyloxy.

15

- Beispiele für Heteroalkylgruppen sind Gruppen der Formeln  
 $R^a-O-Y^a-$ ,  $R^a-S-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-CO-Y^a-$ ,  $R^a-O-CO-Y^a-$ ,  
 $R^a-CO-O-Y^a-$ ,  $R^a-CO-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CO-Y^a-$ ,  
 $R^a-O-CO-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CO-O-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CO-N(R^c)-Y^a-$ ,  
20  $R^a-O-CO-O-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-C(=NR^d)-N(R^c)-Y^a-$ ,  $R^a-CS-Y^a-$ ,  
 $R^a-O-CS-Y^a-$ ,  $R^a-CS-O-Y^a-$ ,  $R^a-CS-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CS-Y^a-$ ,  
 $R^a-O-CS-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CS-O-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CS-N(R^c)-Y^a-$ ,  
 $R^a-O-CS-O-Y^a-$ ,  $R^a-S-CO-Y^a-$ ,  $R^a-CO-S-Y^a-$ ,  $R^a-S-CO-N(R^b)-Y^a-$ ,  
 $R^a-N(R^b)-CO-S-Y^a-$ ,  $R^a-S-CO-O-Y^a-$ ,  $R^a-O-CO-S-Y^a-$ ,  $R^a-S-CO-S-Y^a-$ ,  
25  $R^a-S-CS-Y^a-$ ,  $R^a-CS-S-Y^a-$ ,  $R^a-S-CS-N(R^b)-Y^a-$ ,  $R^a-N(R^b)-CS-S-Y^a-$ ,  
 $R^a-S-CS-O-Y^a-$ ,  $R^a-O-CS-S-Y^a-$ , wobei  $R^a$  ein Wasserstoffatom, eine  $C_1-C_6$ -Alkyl-, eine  $C_2-C_6$ -Alkenyl- oder eine  $C_2-C_6$ -Alkynylgruppe;  $R^b$  ein Wasserstoffatom, eine  $C_1-C_6$ -Alkyl-, eine  $C_2-C_6$ -Alkenyl- oder eine  $C_2-C_6$ -Alkynylgruppe;  $R^c$  ein  
30 Wasserstoffatom, eine  $C_1-C_6$ -Alkyl-, eine  $C_2-C_6$ -Alkenyl- oder eine  $C_2-C_6$ -Alkynylgruppe;  $R^d$  ein Wasserstoffatom, eine  $C_1-C_6$ -Alkyl-, eine  $C_2-C_6$ -Alkenyl- oder eine  $C_2-C_6$ -Alkynylgruppe und  $Y^a$  eine direkte Bindung, eine  $C_1-C_6$ -Alkyl-, eine  $C_2-C_6$ -

Alkenylen- oder eine C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinylen-Gruppe ist, wobei jede Heteroalkylgruppe mindestens ein Kohlenstoffatom enthält und ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor- oder Chloratome ersetzt sein können. Konkrete Beispiele für Heteroalkylgruppen sind Methoxy, Trifluormethoxy, Ethoxy, n-Propyloxy, iso-Propyloxy, tert-Butyloxy, Methoxymethyl, Ethoxymethyl, Methoxyethyl, Methylamino, Ethylamino, Dimethylamino, Diethylamino, iso-Propylethylamino, Methylaminomethyl, Ethylaminomethyl, Di-iso-Propylaminoethyl, Enolether, Dimethylaminomethyl, Dimethylaminoethyl, Acetyl, Propionyl, Butyryloxy, Acetyloxy, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, N-Ethyl-N-Methylcarbamoyl oder N-Methylcarbamoyl. Weitere Beispiele für Heteroalkylgruppen sind Nitril-, Isonitril, Cyanat-, Thiocyanat-, Isocyanat-, Isothiocyanat und Alkylnitril-gruppen.

Der Ausdruck Cycloalkyl bezieht sich auf eine gesättigte oder teilweise ungesättigte (z. B. Cycloalkenyl) cyclische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe (bevorzugt 1 oder 2) aufweist, welche insgesamt 3 bis 14 Ring-Kohlenstoffatome, vorzugsweise 3 bis 10 (insbesondere 3, 4, 5, 6 oder 7) Ring-Kohlenstoffatome enthalten. Der Ausdruck Cycloalkyl bezieht sich weiterhin auf derartige Gruppen, bei denen ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, =O, SH, =S, NH<sub>2</sub>, =NH oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind also z. B. cyclische Ketone wie z. B. Cyclohexanon, 2-Cyclohexanon oder Cyclopentanon. Weitere konkrete Beispiele für Cycloalkylgruppen sind die Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl-, Spiro[4,5]decanyl-, Norbornyl-, Cyclohexyl-, Cyclopentenyl-, Cyclohexadienyl-, Decalanyl-, Cubanyl-, Bicyclo[4.3.0]nonyl-, Tetralin-, Cyclopentylcyclohexyl-, Fluorcyclohexyl- oder die Cyclohex-2-enyl-Gruppe.

Der Ausdruck Heterocycloalkyl bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe wie oben definiert, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Ring-Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Silizium-, Selen-, Phosphor- oder Schwefelatom (bevorzugt Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff) ersetzt sind. Bevorzugt besitzt eine Heterocycloalkylgruppe 1 oder 2 Ringe mit 3 bis 10 (insbesondere 3, 4, 5, 6 oder 7) Ringatomen. Der Ausdruck Heterocycloalkyl bezieht sich weiterhin auf derartige Gruppen, bei denen ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, =O, SH, =S, NH<sub>2</sub>, =NH oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Beispiele sind die Piperidyl-, Morpholinyl-, Urotropinyl-, Pyrrolidinyl-, Tetrahydrothiophenyl-, Tetrahydropyranyl-, Tetrahydrofuryl-, Oxacyclopropyl-, Azacyclopropyl- oder 2-Pyrazolinyl-Gruppe sowie Lactame, Lactone, cyclische Imide und cyclische Anhydride.

Der Ausdruck Alkylcycloalkyl bezieht sich auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen sowohl Cycloalkyl- wie auch Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppen enthalten, z. B. Alkylcycloalkyl-, Alkylcycloalkenyl-, Alkenylcycloalkyl- und Alkynylcycloalkylgruppen. Bevorzugt enthält eine Alkylcycloalkylgruppe eine Cycloalkylgruppe, die einen oder zwei Ringsysteme aufweist, welche insgesamt 3 bis 10 (insbesondere 3, 4, 5, 6 oder 7) Kohlenstoffatome enthält und eine oder zwei Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppen mit 1 oder 2 bis 6 Kohlenstoffatomen.

30

Der Ausdruck Heteroalkylcycloalkyl bezieht sich auf Alkylcycloalkylgruppen, wie oben definiert, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2 oder 3) Kohlenstoffatome durch ein

Sauerstoff-, Stickstoff-, Silizium-, Selen-, Phosphor- oder Schwefelatom (bevorzugt Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff) ersetzt sind. Bevorzugt besitzt eine Heteroalkylcycloalkylgruppe 1 oder 2 Ringsysteme mit 3 bis 10 (insbesondere 3, 4, 5, 6 oder 7) Ringatomen und eine oder zwei Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Heteroalkylgruppen mit 1 oder 2 bis 6 Kohlenstoffatomen. Beispiele derartiger Gruppen sind Alkylheterocycloalkyl, Alkylheterocycloalkenyl, Alkenylheterocycloalkyl, Alkynylheterocycloalkyl, Heteroalkylcycloalkyl, Heteroalkylheterocycloalkyl und Heteroalkylheterocycloalkenyl, wobei die cyclischen Gruppen gesättigt oder einfach, zweifach oder dreifach ungesättigt sind.

Der Ausdruck Aryl bzw. Ar bezieht sich auf eine aromatische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe hat, die insgesamt 6 bis 14 Ring-Kohlenstoffatome, vorzugsweise 6 bis 10 (insbesondere 6) Ring-Kohlenstoffatome enthalten. Der Ausdruck Aryl (bzw. Ar) bezieht sich weiterhin auf derartige Gruppen, bei denen ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, SH, NH<sub>2</sub>, oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Beispiele sind die Phenyl-, Naphthyl-, Biphenyl-, 2-Fluorphenyl, Anilinyll-, 3-Nitrophenyl oder 4-Hydroxyphenyl-Gruppe.

25

Der Ausdruck Heteroaryl bezieht sich auf eine aromatische Gruppe, die einen oder mehrere Ringe hat, welche insgesamt 5 bis 14 Ringatome, vorzugsweise 5 bis 10 (insbesondere 5 oder 6) Ringatome enthalten und ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2, 3 oder 4) Sauerstoff-, Stickstoff-, Phosphor- oder Schwefel-Ringatome (bevorzugt O, S oder N) enthalten. Der Ausdruck Heteroaryl bezieht sich weiterhin auf derartige Gruppen, bei denen ein oder mehrere Wasser-



stoffatome durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, SH, NH<sub>2</sub>, oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Beispiele sind 4-Pyridyl-, 2-Imidazolyl-, 3-Phenylpyrrolyl-, Thiazolyl-, Oxazolyl-, Triazolyl-, Tetrazolyl-, Isoxazolyl-, Indazolyl-,  
5 Indolyl-, Benzimidazolyl-, Pyridazinyl-, Chinolinyl-, Purinyl-, Carbazolyl-, Acridinyl-, Pyrimidyl-, 2,3'-Bifuryl-, 3-Pyrazolyl- und Isochinolinyl-Gruppen.

Der Ausdruck Aralkyl bezieht sich auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen sowohl Aryl- wie auch Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- und/oder Cycloalkylgruppen enthalten, wie z. B. Arylalkyl-, Arylalkenyl-, Arylalkinyl-, Arylcycloalkyl-, Arylcycloalkenyl-, Alkylarylcycloalkyl- und Alkylarylcycloalkenylgruppen. Konkrete Beispiele für Aralkyle  
15 sind Toluol, Xylol, Mesitylen, Styrol, Benzylchlorid, o-Fluortoluol, 1H-Inden, Tetralin, Dihydronaphthaline, Indanon, Phenylcyclopentyl, Cumol, Cyclo-hexylphenyl, Fluoren und Indan. Bevorzugt enthält eine Aralkylgruppe ein oder zwei aromatische Ringsysteme (1 oder 2 Ringe) mit  
20 insgesamt 6 bis 10 Ring-Kohlenstoffatomen und ein oder zwei Alkyl-, Alkenyl- und/oder Alkinylgruppen mit 1 oder 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und/oder eine Cyclo-alkylgruppe mit 5 oder 6 Ringkohlenstoffatomen.

25 Der Ausdruck Heteroaralkyl bezieht sich auf eine Aralkylgruppe wie oben definiert, in der ein oder mehrere (bevorzugt 1, 2, 3 oder 4) Kohlenstoffatome durch ein Sauerstoff-, Stickstoff-, Silizium-, Selen-, Phosphor-, Bor- oder Schwefelatom (bevorzugt Sauerstoff, Schwefel oder  
30 Stickstoff) ersetzt sind, d. h. auf Gruppen, die entsprechend den obigen Definitionen sowohl Aryl- bzw. Heteroaryl- wie auch Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl- und/oder Heteroalkyl- und/oder Cycloalkyl- und/oder Heterocyclo-

alkylgruppen enthalten. Bevorzugt enthält eine Heteroaralkylgruppe ein oder zwei aromatische Ringsysteme (1 oder 2 Ringe) mit insgesamt 5 oder 6 bis 10 Ring-Kohlenstoffatomen und ein oder zwei Alkyl-, Alkenyl- und/oder Alkinyllgruppen mit 1 oder 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und/oder eine Cycloalkylgruppe mit 5 oder 6 Ringkohlenstoffatomen, wobei 1, 2, 3 oder 4 dieser Kohlenstoffatome durch Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome ersetzt sind.

10

Beispiele sind Arylheteroalkyl-, Arylheterocycloalkyl-, Arylheterocycloalkenyl-, Arylalkylheterocycloalkyl-, Arylalkenylheterocycloalkyl-, Arylalkinylheterocycloalkyl-, Arylalkylheterocycloalkenyl-, Heteroarylalkyl-, Heteroarylalkenyl-, Heteroarylalkinyl-, Heteroarylheteroalkyl-, Heteroarylcycloalkyl-, Heteroarylcycloalkenyl-, Heteroarylheterocycloalkyl-, Heteroarylheterocycloalkenyl-, Heteroarylalkylcycloalkyl-, Heteroarylalkylheterocycloalkenyl-, Heteroarylheteroalkylcycloalkyl-, Heteroarylheteroalkylcycloalkenyl- und Heteroarylheteroalkylheterocycloalkyl-Gruppen, wobei die cyclischen Gruppen gesättigt oder einfach, zweifach oder dreifach ungesättigt sind. Konkrete Beispiele sind die Tetrahydroisochinolinyll-, Benzoyl-, 2- oder 3-Ethylindolyl-, 4-Methylpyridino-, 2-, 3- oder 4-Methoxyphenyl-, 4-Ethoxyphenyl-, 2-, 3- oder 4-Carboxyphenylalkylgruppe.

Die Ausdrücke Cycloalkyl, Heterocycloalkyl, Alkylcycloalkyl, Heteroalkylcycloalkyl, Aryl, Heteroaryl, Alkyl und Heteroaralkyl beziehen sich auch auf Gruppen, in denen ein oder mehrere Wasserstoffatome solcher Gruppen durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, =O, SH, =S, NH<sub>2</sub>, =NH oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind.

Der Ausdruck "gegebenenfalls substituiert" bezieht sich auf Gruppen, in denen ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor-, Chlor-, Brom- oder Jodatome oder OH, =O, SH, =S, NH<sub>2</sub>, =NH oder NO<sub>2</sub>-Gruppen ersetzt sind. Dieser Ausdruck  
5 bezieht sich weiterhin auf Gruppen, die ausschließlich oder zusätzlich mit unsubstituierten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkenyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkynyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Heteroalkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> Cycloalkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> Heterocycloalkyl-, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> Aryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> Heteroaryl-, C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> Aralkyl- oder C<sub>2</sub>-C<sub>11</sub> Heteroaralkyl-Gruppen substituiert sind.

10

Der Ausdruck Linker bezieht sich auf eine Gruppe, die dazu verwendet wird, Verbindungen der Formel (I) mit einem Polymer oder einem Biomolekül zu verbinden. Ein Linker kann eine direkte Bindung, eine Alkylen-, Alkenylen-, Alkinylen-, Heteroalkylen-, Arylen-, Heteroarylen-, Cycloalkylen-, Alkyl-  
15 cycloalkylen-, Heteroalkylcycloalkylen-, Heterocycloalkylen-, Aralkylen- oder eine Heteroaralkylengruppe sein. Bevorzugt ist der Linker im Blut-Plasma stabil (insbesondere hydrolysestabil), metabolisch spaltbar und nach der Spaltung  
20 nicht toxisch.

Beispiele für Linker sind in P. Seneci, Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies, John Wiley & Sons, New York, 2000; D. Obrecht und J. M. Villalgordo, Solid-  
25 Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries, Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 17, Elsevier Science Ltd, Oxford, 1998 sowie in F. Z. Dörwald, Organic Synthesis on Solid Phase, Wiley-VCH, Weinheim, 2000 beschrieben, welche  
30 Beispiele hier unter Bezugnahme aufgenommen sind. Beispielfhaft seien hier der Trityllinker, der Wang-Linker, der SASRIN<sup>TM</sup>-Linker, der Rink-Säure-Linker, der Benzhydrylalkohol-Linker, der HMBA-Linker sowie polymeres

Benzylhalogenid (Linker des Merrifield Harzes) sowie der PAM-Linker genannt.

Als Polymere kommen insbesondere synthetische Polymere in Frage, wie z. B. Polyethylenglycol (MW = 200, 300, 400, 5 30.000, 35.000, 40.000; insbesondere MW 25.000 - 100.000 Da, vorzugsweise 25.000 - 50.000 Da), Polyethylenglycol Dendri- mere, Polyacrylsäure, Hydroxyethylstärke (HES) Poly-lactid-co-glycolid, poly-D,L-lacticacid-p-dioxanonepoly-ethylene 10 glycol block copolymer (PLA-DX-PEG), Poly(ortho)ester, Poly- glutamate, Polyaspartate, Polymer aus  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten monomeren: (meth)acrylic acid, crotonic acid, maleic acid, maleic anhydride, fumaric acid, itaconic acid/anhydride, etc. comonomere umfassend: Vinylether, Vinylester, Vinyla- 15 mide, Olefine, Diallyl-dialkyl-ammonium-halogene, bevorzugt Vinylether, Poly-(diethylenglycoladipat), Polyethylenimin, Polyglycolid, Polyharnstoff, Polylimonen (=Polylimo), Poly(2-methyl-1,3-propylenadipat), Propfpolymere, Graft (Block-) Polymere mit anderen Polymeren.

20

Als Biomoleküle kommen z. B. Glycoproteine, Lipoproteine, Lectine, Hormone z.B. Somatostatin bzw. Somatostatin- Analoga, synthetische Hormonanaloga, Albumin, Liposome, DNA, Dextran, Biotin, Streptavidin, Avidin, Zellen oder 25 Antikörper in Frage. Bevorzugt ist das Biomolekül ein Antikörper; besonders bevorzugt ein monoklonaler Antikörper (z. B. Herceptin).

Weitere Beispiele für Linker, Polymere und Biomoleküle sind 30 in G. T. Hermanson, Biokonjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996 beschrieben, welche Beispiele hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

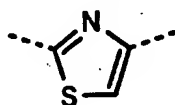
Verbindungen der Formel (I) können aufgrund ihrer Substitution ein oder mehrere Chiralitätszentren enthalten. Die vorliegende Erfindung umfasst daher sowohl alle reinen Enantiomere und alle reinen Diastereomere, als auch deren  
5 Gemische in jedem Mischungsverhältnis.

Bevorzugt ist X eine CH<sub>2</sub>-Gruppe.

Wiederum bevorzugt ist Y ein Sauerstoffatom.

10

Weiter bevorzugt weist A die folgende Struktur auf:



Des weiteren bevorzugt sind R<sup>1</sup> und R<sup>3</sup> zusammen Teil eines  
15 Cycloalkylrings; besonders bevorzugt weisen R<sup>1</sup> und R<sup>3</sup> zusammen die Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>- auf.

Weiter bevorzugt ist R<sup>2</sup> eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkylgruppe, besonders bevorzugt eine Methylgruppe.

20

Des weiteren bevorzugt sind R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> und R<sup>10</sup> Wasserstoffatome.

Wiederum bevorzugt ist R<sup>7</sup> eine Alkylgruppe; besonders  
25 bevorzugt eine Gruppe der Formel -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

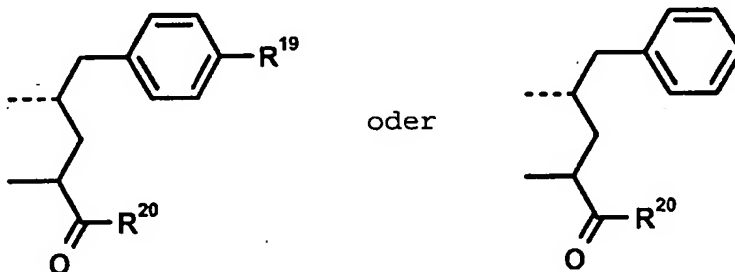
Des weiteren bevorzugt ist R<sup>8</sup> ein Wasserstoffatom, eine Alkyl-, Alkenyl- oder eine Heteroalkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel -CH<sub>2</sub>OC(=O)R<sup>17</sup>, wobei R<sup>17</sup> eine  
30 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> Alkenylgruppe ist.

Wiederum bevorzugt ist  $R^9$  eine Alkylgruppe; besonders bevorzugt eine Gruppe der Formel  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .

Weiter bevorzugt ist  $R^{11}$  ein Wasserstoffatom oder eine  
5 Acetylgruppe.

Weiter bevorzugt ist  $R^{12}$  eine Gruppe der Formel  $\text{NHR}^{18}$ , wobei  $R^{18}$  eine Heteroaralkylgruppe ist.

10 Besonders bevorzugt weist  $R^{18}$  die folgenden Strukturen auf:



wobei  $R^{19}$  und  $R^{20}$  unabhängig voneinander Wasserstoffatome, OH,  $\text{NH}_2$ , Alkyloxy-, Alkenyloxy-, Alkinyloxy-, Heteroalkyl-,  
15 Aryloxy-, Heteroaryloxy-, Cycloalkyloxy-, Alkylcycloalkyloxy-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocycloalkyloxy-, Aralkyloxy- oder Heteroaralkylgruppen sind; besonders bevorzugt sind  $R^{19}$  und  $R^{20}$  Hydroxygruppen. Gegebenenfalls  
20 sein (z. B. durch eine  $\text{NO}_2$ -Gruppe).

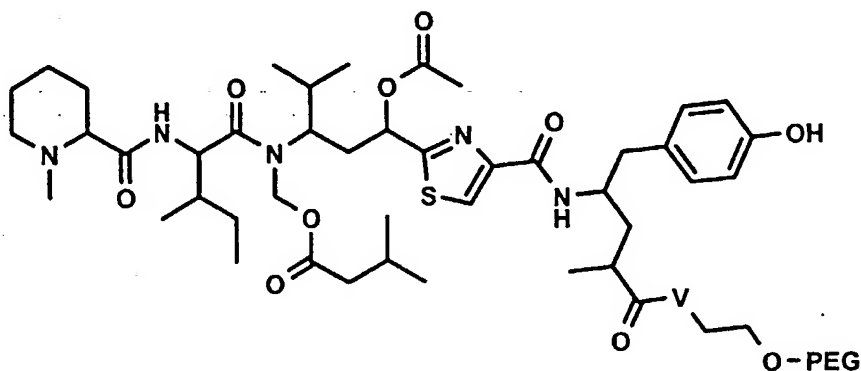
Besonders bevorzugt ist die Verbindung der Formel (I) Tubulysin A.

25 Weiter bevorzugt ist der Linker über die Reste  $R^8$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{19}$  oder  $R^{20}$  an Verbindungen der Formel (I) gebunden; besonders bevorzugt über  $R^{19}$  oder  $R^{20}$ .

Des weiteren bevorzugt ist das Polymer ein Polyethylenglycol  
PEG (insbesondere ein PEG mit einem Molekulargewicht von  
mehr als 30 kDa bis 100 kDa, vorzugsweise von max. 50 kDa),  
das insbesondere über R<sup>20</sup> (gegebenenfalls mit einem Linker V)  
5 an Tubulysin A gebunden ist.

Besonders bevorzugt weisen die erfindungsgemässen Konjugate  
(U-V-W) die folgende Formel auf, wobei die Stereochemie der  
des natürlichen Tubulysin A entspricht:

10



Bevorzugt ist V ein Sauerstoffatom, eine NH-Gruppe oder eine  
Gruppe der Formel -O-(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-O- (wobei R<sup>a</sup> und R<sup>b</sup> unabhängig  
15 voneinander C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkylgruppen oder zusammen Teil einer  
Cycloalkylgruppe sind und n gleich 1 oder 2 ist), -NH-R<sup>c</sup>-NH-  
CO-CH<sub>2</sub>-O-, -O-R<sup>c</sup>-O-CO-CH<sub>2</sub>-O- oder eine Gruppe der Formel -O-  
R<sup>c</sup>-O- (wobei R<sup>c</sup> eine Alkylen, Arylen oder Cycloalkylengruppe  
ist) ist.

20

Pharmakologisch akzeptable Salze, Solvate, Hydrate oder  
Formulierungen der hier beschriebenen Konjugate sind  
ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Beispiele  
für pharmakologisch akzeptable Salze der Verbindungen der  
25 Formel (I) sind Salze von physiologisch akzeptablen  
Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure

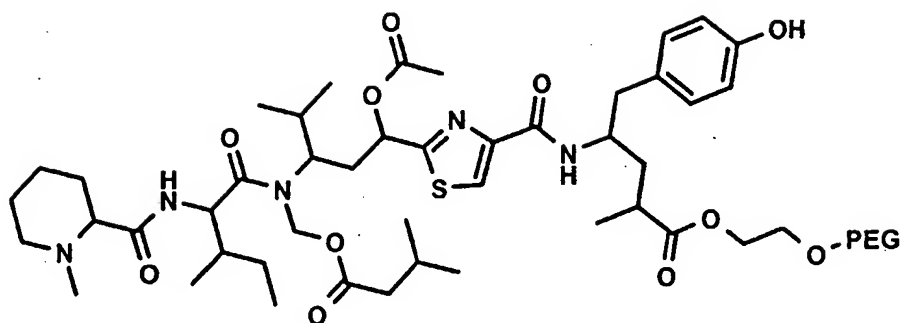
- oder Salze von organischen Säuren wie Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Salicylsäure. Verbindungen der Formel
- 5 (I) können solvatisiert, insbesondere hydratisiert sein. Die Hydratisierung kann z.B. während des Herstellungsverfahrens oder als Folge der hygroskopischen Natur der anfänglich wasserfreien Verbindungen der Formel (I) auftreten.
- 10 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten mindestens eine Verbindung der Formel (I) als Wirkstoff und fakultativ Trägerstoffe und/oder Adjuvantien.
- 15 Die therapeutische Verwendung der Verbindungen der Formel (I), ihrer pharmakologisch akzeptablen Salze bzw. Solvate und Hydrate sowie Formulierungen und pharmazeutischen Zusammensetzungen liegt ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung.
- 20 Auch die Verwendung dieser Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Des weiteren sind die vorliegenden Verbindungen bei der Vorbeugung und/oder
- 25 Behandlung von Pilzkrankungen (d.h. als antifugale Mittel), rheumatoider Arthritis, entzündlichen Erkrankungen, Immunologisch bedingten Krankheiten (z. B. Diabetes Typ 1), Autoimmunkrankheiten sowie weiteren Tumorerkrankungen von großem Interesse. Im allgemeinen werden Verbindungen der
- 30 Formel (I) unter Anwendung der bekannten und akzeptablen Modi, entweder einzeln oder in Kombination mit einem beliebigen anderen therapeutischen Mittel verabreicht. Solche therapeutisch nützlichen Mittel werden bevorzugt



parenteral, z.B. als injizierbare Lösung verabreicht. Zur Herstellung von flüssigen Lösungen kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B. Wasser, Alkohole oder wäßrige Salzlösungen verwenden. Die pharmazeutisch verwendbaren Mittel  
5 können auch Zusatzstoffe zur Konservierung, Stabilisierung, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer und Antioxidantien enthalten.

Kombinationen mit anderen therapeutischen Mitteln können  
10 weitere Wirkstoffe beinhalten, die gewöhnlich zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

## Beispiele



5

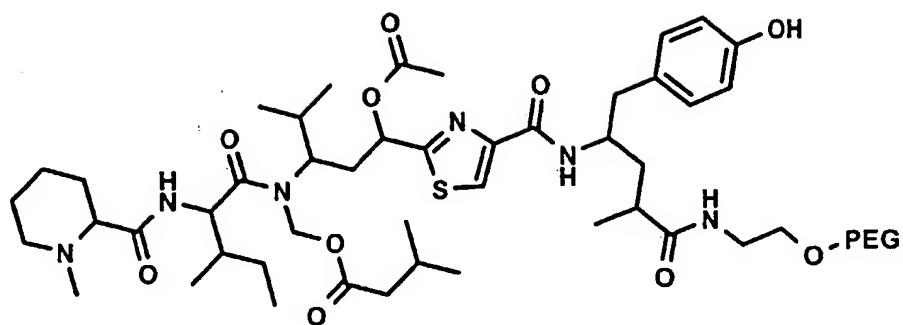
Zu einer Lösung von 0.056 mmol Tubulysin A und 0.125 mmol PEG (6 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 35 kDa bzw. 40 kDa) in einem Gemisch aus 3 ml Acetonitril und 1 ml DMF wurden bei 0°C 0.1 mmol 2-Chloro-1-methylpyridiniumiodid (Mukaiyama Reagenz) und 0.2 mmol 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2h bei 0°C und weitere 60h bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde die Mischung einrotiert, mit 15 ml Dichlormethan versetzt und mit je 5 ml Wasser, NaHCO<sub>3</sub> (aq), Wasser sowie gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 8 ml DCM gelöst, unter Rühren mit trockenem Ether versetzt, bis die Lösung trüb wurde und für eine Stunde stehengelassen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Ether gewaschen. Die gewünschten Produkte wurden als weisses Pulver erhalten.

10

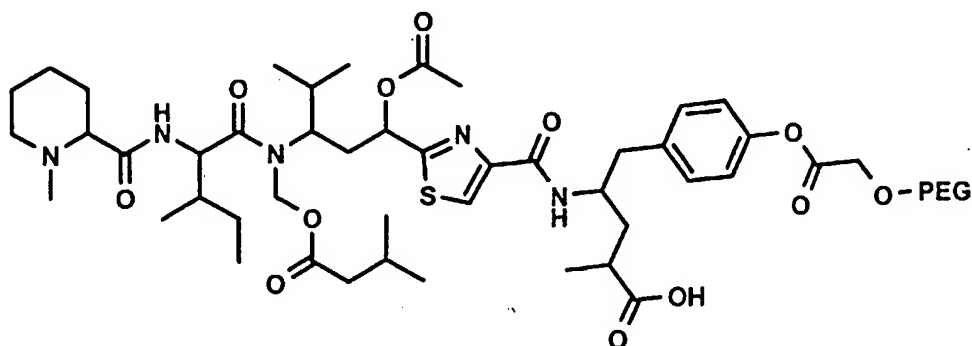
15

20

18



Die Diamine der Polyethylenglycole (6 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 35 kDa bzw. 40 kDa) sowie ihre Verknüpfung mit Tubulysin A wurden analog zu dem in R. B. Greenwald et al. Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 551-562 beschriebenen Verfahren hergestellt.

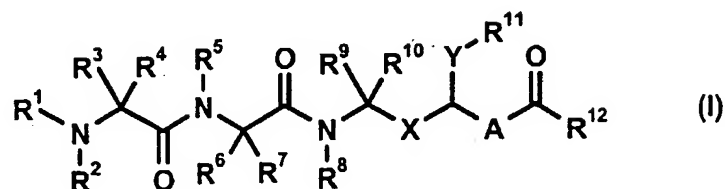


10 Die PEG Dicarbonsäuren (6 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 35 kDa bzw.  
40 kDa) sowie ihre Verknüpfung mit Tubulysin A wurden analog  
zu dem in R. B. Greenwald et al. J. Med. Chem. 1996, 39,  
424-431 beschriebenen Verfahren hergestellt.

## Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel U-V-W, wobei

5 U die Formel (I) aufweist,



wobei

10

A ein gegebenenfalls substituierter 5- oder 6-gliedriger Heteroarylenrest ist;

15

X ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{13}$  oder  $\text{CR}^{14}\text{R}^{15}$  ist;

20

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe der Formel  $\text{NR}^{16}$  ist und  
die Reste  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$ ,  $\text{R}^{10}$ ,  $\text{R}^{11}$ ,  $\text{R}^{12}$ ,  $\text{R}^{13}$ ,  $\text{R}^{14}$ ,  $\text{R}^{15}$  und  $\text{R}^{16}$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Cycloalkyl-, Alkylcycloalkyl-, Heteroalkylcycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Aralkyl- oder ein Heteroaralkylrest, oder zwei der Reste gemeinsam Teil eines Cycloalkyl- oder Heterocycloalkylringsystems sind,

25

V ein Linker und W ein Polymer oder ein Biomolekül ist.

30

2. Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Verbindung der Formel (I) Tubulysin A ist.
3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Polymer  
5 ein Polyethylenglycol (PEG) ist.
4. Verbindungen nach Anspruch 3, wobei das Polyethylen-  
glycol ein Molekulargewicht von mehr als 30 kDa  
aufweist.
- 10 5. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das  
Biomolekül ein Antikörper ist.
6. Verwendung eines Biokonjugats nach einem der Ansprüche  
15 1 bis 5 zur Behandlung von Krebserkrankungen.